

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19731

研究課題名(和文)円形脱毛症の病態形成におけるTCRV 1+ T細胞の新規の役割

研究課題名(英文)A new role of TCR V delta 1+ gamma delta T cells in the pathogenesis of alopecia areata

研究代表者

内田 洋平 (UCHIDA, Youhei)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：30571856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：円形脱毛症は、自己免疫疾患であり、細胞障害性T細胞が病態形成に関与する。本研究では新たに、円形脱毛症患者の病変部毛包における T細胞(V 1T細胞)の増加と、末梢血液中における V 1T細胞の各種発現の変化(分化段階の進行・皮膚遊走性マーカーであるCXCR3とCXCR4の発現増強・細胞障害と活性化マーカーであるCD107aの増強・免疫寛容減弱を示唆するPD-1の発現低下)が健常者と比べて明らかとなった。これらの成果は、円形脱毛症において、 T細胞はV 1T細胞特異的に活性化し、免疫寛容を回避している可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Alopecia areata (AA) is an autoimmune disease. Cytotoxic T-cells mediate premature AA HF induction. In this study, T cells were detected in and around AA HFs. Terminally differentiated effector memory (CD45RA+CD27-) V 1 T cells significantly increases in AA patient as compared with healthy donors. CD107a is a marker of cell-activation and degranulation of cytotoxic molecule. There is a marked increase of CD107a+V 1 T cells in AA patient. CXCR3 and CXCR4, chemokine receptors for T-cell chemoattractant, were upregulated in AA patients. Furthermore, V 1 T cells has reduced expression of PD-1, a negative regulator, in AA patient. These findings suggest the cytotoxic and skin migratory ability escaping from self-tolerance of AA recruiting T-cells.

研究分野：皮膚免疫、脱毛症

キーワード： T細胞 円形脱毛症

### 1. 研究開始当初の背景

円形脱毛症はT細胞を介した自己免疫疾患である(Gilhar A *et al.* 2012)。組織学的に病変部毛包内・周囲へNKG2D<sup>+</sup>T細胞(主にCD8T細胞)の密な浸潤が認められること、円形脱毛症の病変部毛包において、NKG2DリガンドであるMICAやT細胞遊走因子であるCXCL10の発現上昇(Ito T *et al.* 2008 and 2013)が報告されていることや、マウスモデルの実験から(Gilhar A *et al.* 2013)、毛包周囲に浸潤したNKG2D<sup>+</sup>T細胞による毛包障害が、脱毛症の原因の一つと考えられている。申請者らは新たにNKG2D<sup>+</sup>T細胞が病変部毛包内・周囲に増加することを明らかにした。ヒト

T細胞は、主にT cell receptor (TCR)V1<sup>+</sup>T細胞(V1T細胞)とTCRV2<sup>+</sup>T細胞(V2T細胞)に分けられるが、円形脱毛症の毛包周囲には、V1<sup>+</sup>T細胞が特異的に増加する予備的実験データを得ており、TCRV1特異的な活性化機序を明らかにすることが、円形脱毛症の病態解明につながる可能性を考えて、本研究を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、円形脱毛症におけるT細胞のTCRV1特異的な活性化機序を明らかにするとともに、TCRV2<sup>+</sup>T細胞が増加する乾癬、または、健常者のT細胞と比較し、円形脱毛症に特異的な病態を見出すものである。これらが解明されれば、円形脱毛症の新たな病態メカニズムの構築とT細胞をターゲットにした新規治療法の開発につながるかと期待される。

### 3. 研究の方法

申請者らは、円形脱毛症におけるV1T細胞の特異的な活性化機序を明らかにするために、治療前後の比較、V2T細胞との比較、乾癬患者、または、健常者のT細胞との比較、各種刺激因子に対する反応性の解析を計画した。本研究は、鹿児島大学臨床研究倫理委員会の承認を得ており(承認番号:28-208)、十分に関係法令に配慮して行われた。

#### (1) 血液採取

末梢血から比重遠心法で末梢血単核球細胞を分離し、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの解析に用いる。

#### (2) 末梢血 T細胞のサブタイプと細胞表面マーカーの解析(診断時)

診断時の採血で分離した末梢血単核球細胞を用いて、フローサイトメトリーでCD3<sup>+</sup>TCRV1<sup>+</sup>細胞(V1T細胞)とCD3<sup>+</sup>TCRV2<sup>+</sup>細胞(V2T細胞)におけるCD25、CD69、CD27、CD45RA、NKG2D、CD107a、CD200R、

PD-1、CXCR3、CXCR4の発現を解析する。病変部毛包ではNKG2DのリガンドであるMICAの発現が増強している(Ito T *et al.* 2008)。円形脱毛症の病変部毛包においてはNKG2D<sup>+</sup>V1T細胞が浸潤していたことから、末梢血由来のT細胞サブタイプやNKG2Dの発現に違いがみられるかどうかを検討する。また、毛包に発現する(immune privilegeの形成に重要な)抑制性分子CD200とPD-L1(Gilhar A *et al.* 2012; Wang X *et al.* 2014)のT細胞における受容体(CD200RとPD-1)の発現を解析し、円形脱毛症におけるT細胞の抑制機構に異常がみられるかどうかを検討する。さらに、CD27とCD45RAの発現パターンによるT細胞の分化段階の解析、活性化・脱顆粒のマーカーであるCD107a、そしてケモカインレセプター(CXCR3およびCXCR4)の発現について解析する。

#### (3) 末梢血 T細胞のサブタイプと細胞表面マーカーの解析(治療後)

治療後の採血で分離した末梢血単核球細胞を用いて、T細胞の性状をフローサイトメトリーで解析する。

#### (4) 末梢血 T細胞の各種刺激に対する反応性の比較

TCRV1を特異的に活性化する刺激因子を同定するために、健常者から分離した末梢血単核球細胞を用いて、Toll like receptorのリガンドであるLipopolysaccharide(LPS)、円形脱毛症への関与が指摘されているsubstance P(SP)(Siebenhaar *et al.*, 2007)で刺激し、円形脱毛症でみられるT細胞の表面分子の発現パターンが再現されるかどうかについて検討する。

### 4. 研究成果

当初比較対象として挙げた乾癬患者の本研究への登録数が不足したため、円形脱毛症患者(N=6)と健常者(N=5)について比較解析を行った。

円形脱毛症において、末梢血V1T細胞は健常者と比較して、CD27<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>(Terminally differentiated)T細胞の増加、CXCR4とCD107aの発現増強のほか、PD-1の発現減弱が認められた。これらの結果から、T細胞は病変部の毛包周囲だけではなく、末梢血液中においてもV1T細胞特異的に活性化し、自己反応性が増大している可能性が示唆された。さらに、円形脱毛症の治療後では、V1T細胞におけるCD107aの発現は健常者のレベルにまで発現が減弱していた。また、in vitroで、健常者の末梢血単核球細胞を用いたLPS、SPによる刺激実験を行った結果(N=3)、SPによる刺激が上述した円形脱毛症患者でみられるT細胞の表現型(CD107aの発現増強)を再現した。

この成果は、CD107aなどの細胞表面分子と

SP に対する V 1T 細胞の反応性の解析が、今後、末梢血 V 1T 細胞を特異的に活性化する機序の解明、将来的な円形脱毛症の治療法の確立につながる事を示す重要なものである。

<引用文献>

Gilhar A, Etzioni A, Paus R, Alopecia areata, The New England journal of medicine 366, 2012, 1515-1525.

Gilhar A, Keren A, Shemer A, d'Ovidio R, Ullmann Y, Paus R, Autoimmune disease induction in a healthy human organ: a humanized mouse model of alopecia areata, The Journal of investigative dermatology, 133, 2013, 844-847.

Ito T, Hashizume H, Shimauchi T, Funakoshi A, Ito N, Fukamizu H, Takigawa M, Tokura Y, CXCL10 produced from hair follicles induces Th1 and Tc1 cell infiltration in the acute phase of alopecia areata followed by sustained Tc1 accumulation in the chronic phase, Journal of dermatological science, 69, 2013, 140-147.

Ito T, Ito N, Saatoff M, Hashizume H, Fukamizu H, Nickoloff BJ, Takigawa M, Paus R, Maintenance of hair follicle immune privilege is linked to prevention of NK cell attack, The Journal of investigative dermatology, 128, 2008, 1196-1206.

Siebenhaar F, Sharov AA, Peters EM, Sharova TY, Syska W, Mardaryev AN, Freyschmidt-Paul P, Sundberg JP, Maurer M, Botchkarev VA, Substance P as an immunomodulatory neuropeptide in a mouse model for autoimmune hair loss (alopecia areata), The Journal of investigative dermatology, 127, 2007, 1489-1497.

Wang X, Marr AK, Breitkopf T, Leung G, Hao J, Wang E, Kwong N, Akhoundsadegh N, Chen L, Mui A, Carr N, Warnock GL, Shapiro J, McElwee KJ, Hair follicle mesenchyme-associated PD-L1 regulates T-cell activation induced apoptosis: a potential mechanism of immune privilege, The Journal of investigative dermatology, 134, 2014, 736-745.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Uchida Y, Kanekura T, Two cases of

severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection, J Dermatol, 査読有, Vol.45, No.5, 2018, e106-e107. DOI: 10.1111/1346-8138.14138.

Bertolini M, Pretzlaff M, Sulk M, Bahr M, Gherardini J, Uchida Y, Reibelt M, Kinori M, Rossi A, Biro T, Paus R, Vasoactive intestinal peptide, whose receptor-mediated signalling may be defective in alopecia areata, provides protection from hair follicle immune privilege collapse, The British journal of dermatology, 査読有, Vol.175, No.3, 2016, 531-541. DOI: 10.1111/bjd.14645. 査読有.

[学会発表](計6件)

国内学会(シンポジウム・口頭): 脱毛症の免疫学的病態(第47回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会・第41回皮膚脈管・膠原病研究会) 内田洋平, Marta Bertolini, Ralf Paus, 金蔵拓郎. 2017.

国際学会(一般演題・口頭): Resident dermal V $\delta$ 1+T-cells operate as autoimmunity-promoting stress-sentinels in human skin: Relevance for alopecia areata (10th, World congress for hair research) Youhei Uchida, Jennifer Gherardini, Majid Alam, Aviad Keren, Haiping Zhang, Jérémy Chéret, Akiko Arakawa, Thilo Oelert, Alfredo Rossi, Amos Gilhar, Takuro Kanekura, Marta Bertolini, and Ralf Paus. 2017.

国内学会(一般演題・口頭及びポスター): 頭部の乾癬病変に生じた多毛症の一例(第32回日本乾癬学会学術大会). 内田洋平, 金蔵拓郎. 2017.

国内学会(一般演題・口頭): Human dermal V $\delta$ 1+T-cells recognize "stressed" HFs and may induce alopecia areata. (第177回鹿児島県地方会) Youhei Uchida, Jennifer Gherardini, Majid Alam, Aviad Keren, Haiping Zhang, Jérémy Chéret, Akiko Arakawa, Thilo Oelert, Alfredo Rossi, Amos Gilhar, Takuro Kanekura, Marta Bertolini, and Ralf Paus. 2017.

国内学会(一般演題・口頭及びポスター): Human dermal V $\delta$ 1+T-cells recognize "stressed" HFs and may induce alopecia areata (日本研究皮膚科学会第41回年次学術大会) Youhei Uchida, Jennifer Gherardini, Majid

Alam, Aviad Keren, Haiping Zhang, Jérémy Chéret, Akiko Arakawa, Thilo Oelert, Alfredo Rossi, Amos Gilhar, Takuro Kanekura, Marta Bertolini and Ralf Paus. 2016.

国内学会(一般演題・口頭): Exploring the role of gdT cells in human hair follicle immunopathology: indications that Vd1+T cells are cytotoxic for "stressed" hair follicles and may be involved in alopecia areata (第30回表皮細胞研究会) Youhei Uchida, Jennifer Gherardini, Majid Alam, Aviad Keren, Haiping Zhang, Jérémy Chéret, Akiko Arakawa, Thilo Oelert, Alfredo Rossi, Amos Gilhar, Takuro Kanekura, Marta Bertolini and Ralf Paus. 2016.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<https://com4.kufm.kagoshima-u.ac.jp/images/contents/jouhoukoukai16020128-208.pdf>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内田 洋平 (UCHIDA, Youhei)  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師  
研究者番号：30571856

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )